CE

FLEX
Monoclonal Rabbit
Anti-Human
MutS Protein Homolog 6
Clone EP49
Ready-to-Use
(Link)

English
Code IR086

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49, Ready-to-Use (Link) is intended for use in immunohistochemistry together with Autostainer Link instruments. Antibodies to MutS protein homolog 6 (MSH6) may be useful for the differential identification of colorectal carcinomas. When deficient, MSH6 is associated with the onset of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) (1, 2).The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

MSH6, DNA mismatch repair protein MSH6

Summary and explanation

hMSH6 is a ubiquitously expressed gene encoding the protein MutS protein homolog 6 (MSH6), a 163 kDa nuclear protein involved in the DNA mismatch repair (MMR) pathway. The MMR pathway is utilized by normal proliferating cells to repair mutations that may occur during DNA replication. MSH6 forms a heterodimer with MutS protein homolog 2 (MSH2), which is responsible for the direct recognition of misaligned single nucleotides and insertion-deletion loops. This complex also recruits the MMR proteins PMS2 and MLH1 which, in turn, recruit polymerases, nucleases and other proteins responsible for DNA repair (1).

MSH6 deficiency is often the result of germline mutations in MMR deficient individuals (1). MSH6 loss of function results in an increased mutation rate and contributes to the development of sporadic colorectal carcinoma as well as HNPCC (also called Lynch syndrome). HNPCC, which accounts for 1-5% of all colorectal cancers, is an autosomal dominant condition that results from germline mutations in any of at least four MMR genes including *MSH2* (~40%), *MLH1* (~50%), *MSH6* (~5%) and *PMS2* (<5%) and is associated with increased susceptibility to colon and endometrial cancer and to a lesser degree other types of neoplasms (1-3). A hallmark feature of cancers with defects in the MMR pathway is microsatellite instability (MSI), alterations in the number of microsatellite repeats in the DNA as a result of the faulty repair process (4, 5). A germline mutation in a single MMR gene copy predisposes patients to HNPCC, however, cancer development requires loss of function of the remaining wild-type copy. Mutations in MSH6 account for approximately 5% of all cases of HNPCC (6), however MSH6 is dependent upon MSH2 for stable expression, thus at the protein level, tumors with MSH2 deficiency generally exhibit concomitant loss of MSH6 (7).

Antibodies to MSH6 are useful for identifying mismatch repair deficiencies in tumors of the gastrointestinal tract including HNPCC and associated extracolonic cancers by immunohistochemistry (IHC). MSH6 deficiency as determined by IHC has been reported in endometrial, ovarian, cervical, breast, ampullary, brain and urothelial cancers, as well as sebaceous skin tumors, keratoacanthomas and a subset of hematological malignancies (8-16).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal rabbit antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: EP49. Isotype: Rabbit IgG.

Immunogen

Synthetic peptide corresponding to residues at the N-terminus in human MSH6 protein.

Specificity

In Western blotting of A431 cells lysates, anti-MSH6 clone EP49 recognizes a major band at 160 kDa corresponding to the expected molecular weight of MSH6.

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Quick guide

Step		Comments
Fixation	Formalin	
Pre-treatment	EnVision™ FLEX, High pH (Code K8004)	20 min HIER, 3-in-1 using PT Link and PT Link Rinse Station
Dilution	Ready-to-use	20 min incubation
Dilution buffer	Pre-diluted	
Negative Control	FLEX Negative Control, Rabbit (Code IR600)	20 min incubation
Visualization	EnVision™ FLEX, High pH (Code K8000)	20 min incubation, 2x5 min DAB+
Counterstain	EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008)	5 min incubation
Control Tissue	Appendix, colon	Nuclear staining
Slides	FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)	Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides
Mounting	Non-aqueous, permanent mounting required	After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.
Instrumentation	Autostainer Link 48	Use instrument-specific vials (Code SK201-SK203)

**The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.*

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Pretreating tissues with HIER using diluted EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004) is recommended. Deparaffinization, rehydration and epitope retrieval can be performed in Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to PT Link User Guide. The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 ℃; epitope retrieval temperature and time: 97 ℃ for 20 (±1) minutes; cool down to 65 ℃ . Remove slide rack from PT tank and immediately dip slides in jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station (Code PT109)) containing diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Staining procedure

Visualization: The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH (Link) (Code K8000).

Program: The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the Autostainer Link platform, please contact Dako Technical Services. An Autostainer Link software installer can be found at www.dako.com\Installer. This installer will update DakoLink software with protocol and reagent information for Anti-MSH6, Clone EP49. The short name for the antibody protocol is MSH6 EP49. All incubation steps should be performed at room temperature.

Counterstaining: The recommended counterstain is EnVision™ FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008). For optimal results, non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Controls: Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include appendix or colon and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the “Performance characteristics” section. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Rabbit (Link) (Code IR600).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is predominantly nuclear.

Performance characteristics

Normal tissues: Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49 positively labels the nuclei of a variety of cell types in normal tissue. Although not noted in table below, positive nuclear staining was observed in endothelial cells in many tissue types. (17)

.

Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements	Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements
Adrenal (3)	(3/3) Cortex (30-50%), nuclear	Parathyroid (3)	(3/3) Epithelium (20-90%), nuclear
	(0/3) Medulla	Pituitary (3)	(3/3) Endocrine cells (40-80%), nuclear
Appendix (1)	(1/1) Epithelium (100%), nuclear	Prostate (3)	(3/3) Glandular and ductal

			epithelium (10-80%), nuclear
	(1/1) Extra-follicular lymphocytes (100%), nuclear		(3/3) Stromal cells (30-50%), nuclear
	(1/1) Smooth muscle (100%), nuclear	Salivary gland (3)	(3/3) Ductal epithelium (50-80%), nuclear
Bone marrow (3)	(3/3) Blast cells (10-20%), nuclear		(2/2) Glandular epithelium (50-80%), nuclear
Breast (3)	(1/1) Glandular epithelium (100%), nuclear		(1/1) Smooth muscle (10%), nuclear
	(2/2) Ductal epithelium (100%), nuclear		(1/1) Lymphoid cells (80%), nuclear
	(1/1) Connective tissue (30%), nuclear		(2/2) Connective tissue cells (30%), nuclear
Cerebellum (3)	(3/3) Purkinje cells (50-60%), nuclear	Skeletal muscle (3)	(0/3) Muscle
	(0/3) Glial cells		(3/3) Connective tissue (50%), nuclear
Cerebrum (3)	(2/3) Glial cells (30-50%), nuclear	Skin (3)	(3/3) Basal epithelium (30-80%), nuclear
Cervix (3)	(3/3) Basal epithelium (90%), nuclear		(3/3) Sweat gland (30-80%), nuclear
	(3/3) Stromal cells (30%), nuclear	Small intestine (3)	(3/3) Epithelium (80%), nuclear
Colon (3)	(3/3) Epithelium (80%), nuclear		(3/3) Smooth muscle (50%), nuclear
	(2/2) Lymphocytes (50%), nuclear	Spleen (3)	(2/2) Lymphocytes (60%), nuclear
	(3/3) Connective tissue (40-50%), nuclear		(1/1) Resting lymphocytes (50%), nuclear
Esophagus (3)	(3/3) Squamous epithelium (50-70%), nuclear		(3/3) Sinus lining (red pulp) (20-60%), nuclear
	(3/3) Connective tissue (10-30%), nuclear	Stomach (3)	(1/1) Connective tissue (30%), nuclear
Heart (3)	(3/3) Cardiac cells (10-20%), nuclear		(0/2) Epithelium
	(3/3) Connective tissue (30-50%), nuclear		(0/1) Gastric gland
Kidney (3)	(3/3) Tubule (5-80%), nuclear		(2/2) Smooth muscle (40-50%), nuclear
	(3/3) Bowman's capsule (50%), nuclear		(0/1) Lymphocytes
	(3/3) Glomerulus (20-30%), nuclear	Testis (3)	(3/3) Leydig cells (50-80%), nuclear
Liver (3)	(1/3) Hepatocytes (30%), nuclear		(3/3) Tubular cells (20-30%), nuclear
	(1/3) Bile duct (50%), nuclear	Thymus (3)	(3/3) Cortex (80%), nuclear
Lung (3)	(2/2) Lymphocytes (50%), nuclear		(3/3) Medulla (20-30%), nuclear
	(3/3) Alveolar epithelium (50-80%), nuclear	Thyroid (3)	(1/3) Follicular epithelium (50%), nuclear
Mesothelial cells (3)	(2/2) Mesothelium (100%), nuclear		(1/3) Parafollicular C cells (50%), nuclear
	(3/3) Connective tissue (30%), nuclear	Tonsil (3)	(3/3) Follicular lymphocytes (70-90%), nuclear
Nerve, peripheral (3)	(3/3) Schwann cells (10-20%), nuclear		(3/3) Extra-follicular lymphocytes (20-60%), nuclear
	(3/3) Connective tissue (20-30%), nuclear		(3/3) Epithelium (70-90%), nuclear
Ovary (3)	(3/3) Stromal cells (20-70%), nuclear	Uterus (3)	(3/3) Glandular epithelium (30-60%), nuclear
	(3/3) Follicular epithelium (10-40%), nuclear		(3/3) Stromal cells (10-60%), nuclear
Pancreas (3)	(3/3) Acinar cells (80-90%), nuclear		(3/3) Myometrium (20-30%), nuclear
	(3/3) Islet cells (10-20%), nuclear		
	(3/3) Pancreatic ductal cells (90%), nuclear		

Abnormal tissues: In MSH6 deficient tumors, focal or no nuclear staining is generally observed in the neoplastic cells. A population of benign cells should demonstrate nuclear staining and serve as an internal tissue control.

Tumors that exhibit reduced or heterogeneous expression of MSH6 may also harbor pathogenic mutations in the *MSH6* gene and, in a subset of cases, normal MSH6 expression levels as detected by immunohistochemistry may be observed. Recent data using anti-MSH6, clone 44 showed that 24% of colon adenocarcinomas harboring a pathogenic *MSH6* mutation exhibited normal MSH6 expression (18).

Français
Réf. IR086

Intérêt

Pour diagnostic in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49, Ready-to-Use (Link), est destiné à être utilisé en immunohistochimie avec les appareils Autostainer Link. Les anticorps dirigés contre la protéine MSH6 (MutS protein homolog 6) peuvent être utiles pour l'identification différentielle des cancers colorectaux. Lorsqu'elle est déficiente, MSH6 est associée à l'apparition d'un cancer colorectal héréditaire sans polypose ou syndrome HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) (1, 2). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonymes de l'antigène

MSH6, protéine MSH6 de réparation des mésappariements de l'ADN.

Résumé et explication

hMSH6 est un gène exprimé de manière ubiquitaire codant pour la protéine MSH6 (MutS protein homolog 6), une protéine nucléaire de 163 kDa impliquée dans la voie de réparation des mésappariements (mismatch repair, MMR) de l'ADN. La voie MMR est utilisée par les cellules saines en prolifération afin de réparer les mutations pouvant survenir au cours de la réplication de l'ADN. MSH6 forme un hétérodimère avec MSH2 (MutS protein homolog 2), qui est responsable de la reconnaissance directe des nucléotides uniques non complémentaires et des boucles d'insertion/délétion. Ce complexe recrute également les protéines MMR, PMS2 et MLH1 qui, à leur tour, recrutent des polymérases, des nucléases et d'autres protéines responsables de la réparation de l'ADN (1).

Une déficience en MSH6 est souvent le résultat de mutations au niveau des lignées germinales chez des individus présentant une déficience de la réparation des mésappariements (1). La perte de fonction de MSH6 se traduit par une augmentation du taux de mutations et contribue au développement de cancers colorectaux sporadiques ainsi que du syndrome HNPCC (appelé aussi syndrome de Lynch). Le syndrome HNPCC, qui représente 1 à 5 % de l'ensemble des cancers colorectaux, est une maladie autosomique dominante qui résulte de mutations au niveau des lignées germinales dans au moins un des quatre gènes MMR, y compris *MSH2* (env. 40 %), *MLH1* (env. 50 %), *MSH6* (env. 5 %) et *PMS2* (<5 %), et il est associé à une augmentation de la susceptibilité au cancer du côlon et de l'endomètre et à un moindre degré aux autres types de cancers (1-3). Une caractéristique de marque des cancers présentant des erreurs dans la voie MMR est l'instabilité des microsatellites (MSI), c'est-à-dire des altérations du nombre de répétitions des microsatellites dans l'ADN à cause du processus de réparation défectueux (4, 5). Une mutation au niveau des lignées germinales dans une seule copie d'un gène MMR prédispose les patients à un syndrome HNPCC ; toutefois, le développement d'un cancer nécessite la perte de fonction de la copie du type sauvage restante. Les mutations de MSH6 représentent environ 5 % de l'ensemble des cas de syndrome HNPCC (6) ; toutefois, la stabilité de l'expression de MSH6 dépend de MSH2, ainsi au niveau protéique, les tumeurs ayant une déficience en MSH2 présentent en général une perte concomitante de MSH6 (7).

Les anticorps dirigés contre MSH6 sont utiles pour identifier par immunohistochimie (IHC) les déficiences de la réparation des mésappariements dans les tumeurs de l'appareil digestif, y compris le syndrome HNPCC et les cancers extra-coliques associés. Une déficience en MSH6 déterminée par IHC a été rapportée dans les cancers de l'endomètre, de l'ovaire, du col de l'utérus, du sein, de l'ampoule de Vater, du cerveau et les cancers urothéliaux, ainsi que dans les tumeurs cutanées sébacées, les kératoacanthomes et un sous-ensemble de tumeurs hématologiques (8-16).

Se reporter aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de lapin prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : EP49. Isotype : IgG de lapin.

Immunogène

Peptide synthétique correspondant aux résidus de l'extrémité N-terminale de la protéine MSH6 humaine.

Spécificité

Lors de Western Blots effectués sur des lysats de cellules A431, l'anticorps anti-MSH6 clone EP49 reconnaît une bande principale à 160 kDa qui correspond au poids moléculaire attendu de MSH6.

Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.

4. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Guide rapide*

Étape		Commentaires
Fixation	Formol	
Prétraitement	EnVision™ FLEX, High pH (réf. K8004)	Démasquage des épitopes induit par la chaleur (HIER) de 20 minutes, procédure 3 en 1 à l'aide de l'appareil PT Link et de la station de rinçage du PT Link
Dilution	Prêt à l'emploi	Incubation de 20 minutes
Tampon de dilution	Prédilué	
Contrôle négatif	FLEX Negative Control, Rabbit (réf. IR600)	Incubation de 20 minutes
Visualisation	EnVision™ FLEX, High pH (réf. K8000)	Incubation de 20 minutes, 2 incubations de 5 minutes avec le DAB+
Contre-coloration	EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008)	Incubation de 5 minutes
Tissu de contrôle	Appendice, côlon	Coloration nucléaire
Lames	FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)	Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre
Montage	Milieu de montage permanent non aqueux requis	Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.
Appareillage	Autostainer Link 48	Utiliser les flacons spécifiques à l'appareil (réf. SK201 à SK203)

**L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.*

Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : l'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Prétraitement : le prétraitement des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine par démasquage des épitopes induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Il est recommandé de prétraiter les tissus par la méthode HIER à l'aide de la solution de démasquage des cibles EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004) diluée. Le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage des épitopes peuvent être réalisés dans l'appareil PT Link de Dako (réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se reporter au Manuel d'utilisation du PT Link. Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : température de préchauffage : 65 °C ; température et durée du démasquage des épitopes : 97 °C pendant 20 minutes (±1 minute) ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Retirer le portoir de lames de la cuve PT et plonger immédiatement les lames dans une jarre/cuve (par ex. station de rinçage du PT Link, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (réf. K8007) dilué à température ambiante. Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes.

Les coupes de tissu ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique qui suit. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020). Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Procédure de coloration

Visualisation : le système de visualisation recommandé est le système EnVision™ FLEX, High pH (Link) (réf. K8000).

Programme : les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est de 1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. Se reporter au Manuel d'utilisation de l'Autostainer Link correspondant pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur la plate-forme Autostainer Link, contacter l'assistance technique de Dako. Un programme d'installation du logiciel Autostainer Link peut être obtenu sur www.dako.com\Installer. Ce programme d'installation mettra le logiciel DakoLink à jour avec les informations relatives au protocole et aux réactifs pour l'anticorps anti-MSH6, clone EP49. Le nom abrégé pour le protocole de l'anticorps est MSH6 EP49. Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante.

Contre-coloration : le contre-colorant recommandé est le produit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Link) (réf. K8008). Pour des résultats optimaux, l'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Contrôles : des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps et en suivant le même protocole que les échantillons de patients. Le tissu de contrôle positif doit comprendre l'appendice ou le côlon et les cellules/structures doivent présenter les schémas de réaction décrits pour ces tissus dans la section « Caractéristiques de performance ». Le réactif de contrôle négatif recommandé est le produit FLEX Negative

Control, Rabbit (Link) (réf. IR600).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est principalement nucléaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : l'anticorps Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49, marque de façon positive les noyaux de divers types cellulaires dans les tissus sains. Bien que cela ne soit pas noté dans le tableau ci-après, une coloration nucléaire positive a été observée dans les cellules endothéliales de nombreux types de tissu (17).

Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs	Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs
Surrénale (3)	(3/3) Cortex (30 à 50 %), nucléaire	Parathyroïde (3)	(3/3) Épithélium (20 à 90 %), nucléaire
	(0/3) Moelle	Pituitaire (3)	(3/3) Cellules endocrines (40 à 80 %), nucléaire
Appendice (1)	(1/1) Épithélium (100 %), nucléaire	Prostate (3)	(3/3) Épithélium glandulaire et canalaire (10 à 80 %), nucléaire
	(1/1) Lymphocytes extra-folliculaires (100 %), nucléaire		(3/3) Cellules stromales (30 à 50 %), nucléaire
	(1/1) Muscle lisse (100 %), nucléaire	Glande salivaire (3)	(3/3) Épithélium canalaire (50 à 80 %), nucléaire
Moelle osseuse (3)	(3/3) Blastes (10 à 20 %), nucléaire		(2/2) Épithélium glandulaire (50 à 80 %), nucléaire
Sein (3)	(1/1) Épithélium glandulaire (100 %), nucléaire		(1/1) Muscle lisse (10 %), nucléaire
	(2/2) Épithélium canalaire (100 %), nucléaire		(1/1) Cellules lymphoïdes (80 %), nucléaire
	(1/1) Tissu conjonctif (30 %), nucléaire		(2/2) Cellules du tissu conjonctif (30 %), nucléaire
Cervelet (3)	(3/3) Cellules de Purkinje (50 à 60 %), nucléaire	Muscle squelettique (3)	(0/3) Muscle
	(0/3) Cellules gliales		(3/3) Tissu conjonctif (50 %), nucléaire
Cerveau (3)	(2/3) Cellules gliales (30 à 50 %), nucléaire	Peau (3)	(3/3) Épithélium basal (30 à 80 %), nucléaire
Col de l'utérus (3)	(3/3) Épithélium basal (90 %), nucléaire		(3/3) Glande sudoripare (30 à 80 %), nucléaire
	(3/3) Cellules stromales (30 %), nucléaire	Intestin grêle (3)	(3/3) Épithélium (80 %), nucléaire
Côlon (3)	(3/3) Épithélium (80 %), nucléaire		(3/3) Muscle lisse (50 %), nucléaire
	(2/2) Lymphocytes (50 %), nucléaire	Rate (3)	(2/2) Lymphocytes (60 %), nucléaire
	(3/3) Tissu conjonctif (40 à 50 %), nucléaire		(1/1) Lymphocytes au repos (50 %), nucléaire
Œsophage (3)	(3/3) Épithélium épidermoïde (50 à 70 %), nucléaire		(3/3) Tapis de sinus (pulpe rouge) (20 à 60 %), nucléaire
	(3/3) Tissu conjonctif (10 à 30 %), nucléaire	Estomac (3)	(1/1) Tissu conjonctif (30 %), nucléaire
Cœur (3)	(3/3) Cellules cardiaques (10 à 20 %), nucléaire		(0/2) Épithélium
	(3/3) Tissu conjonctif (30 à 50 %), nucléaire		(0/1) Glande gastrique
Rein (3)	(3/3) Tubule (5 à 80 %), nucléaire		(2/2) Muscle lisse (40 à 50 %), nucléaire
	(3/3) Capsule de Bowman (50 %), nucléaire		(0/1) Lymphocytes
	(3/3) Glomérule (20 à 30 %), nucléaire	Testicule (3)	(3/3) Cellules de Leydig (50 à 80 %), nucléaire
Foie (3)	(1/3) Hépatocytes (30 %), nucléaire		(3/3) Cellules tubulaires (20 à 30 %), nucléaire
	(1/3) Canal biliaire (50 %), nucléaire	Thymus (3)	(3/3) Cortex (80 %), nucléaire
Poumon (3)	(2/2) Lymphocytes (50 %), nucléaire		(3/3) Moelle (20 à 30 %), nucléaire
	(3/3) Épithélium alvéolaire (50 à 80 %), nucléaire	Thyroïde (3)	(1/3) Épithélium folliculaire (50 %), nucléaire
Cellules mésothéliales (3)	(2/2) Mésothélium (100 %), nucléaire		(1/3) Cellules C parafolliculaires (50 %), nucléaire
	(3/3) Tissu conjonctif (30 %),	Amygdale (3)	(3/3) Lymphocytes folliculaires (70

	nucléaire		à 90 %), nucléaire
Nerf périphérique (3)	(3/3) Cellules de Schwann (10 à 20 %), nucléaire		(3/3) Lymphocytes extra-folliculaires (20 à 60 %), nucléaire
	(3/3) Tissu conjonctif (20 à 30 %), nucléaire		(3/3) Épithélium (70 à 90 %), nucléaire
Ovaire (3)	(3/3) Cellules stromales (20 à 70 %), nucléaire	Utérus (3)	(3/3) Épithélium glandulaire (30 à 60 %), nucléaire
	(3/3) Épithélium folliculaire (10 à 40 %), nucléaire		(3/3) Cellules stromales (10 à 60 %), nucléaire
Pancréas (3)	(3/3) Cellules acinaires (80 à 90 %), nucléaire		(3/3) Myomètre (20 à 30 %), nucléaire
	(3/3) Cellules des îlots de Langerhans (10 à 20 %), nucléaire		
	(3/3) Cellules canalaires pancréatiques (90 %), nucléaire		

Tissus tumoraux : dans les tumeurs déficientes en MSH6, une coloration nucléaire localisée ou bien aucune coloration nucléaire n'est habituellement observée dans les cellules néoplasiques. Une population de cellules bénignes doit présenter une coloration nucléaire et servir de tissu de contrôle interne.

Les tumeurs présentant une expression réduite ou hétérogène de MSH6 peuvent également dissimulées des mutations pathogènes dans le gène *MSH6* et, dans un sous-ensemble de cas, il est possible d'observer par immunohistochimie des taux d'expression de MSH6 normaux. Des données récentes utilisant l'anticorps anti-MSH6, clone 44, ont montré que 24 % des adénocarcinomes du côlon dissimulant une mutation pathogène de *MSH6* présentaient une expression de MSH6 normale (18).

Deutsch
Code-Nr. IR086

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik

FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49, Ready-to-Use (Link) ist für die Verwendung in der Immunhistochemie zusammen mit Autostainer Link-Geräten bestimmt. Antikörper zu MutS-Protein-Homolog 6 (MSH6) können bei der Differenzialdiagnose kolorektaler Karzinome hilfreich sein. Ein Defekt von MSH6 wird mit dem Auftreten des erblichen, nicht polypösen kolorektalen Karzinoms (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) assoziiert (1, 2). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme für das Antigen

MSH6, DNA-Mismatch-Repair-Protein MSH6

Zusammenfassung und Erklärung

hMSH6 ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, das das Protein MutS protein homolog 6 (MSH6) kodiert, ein Kernprotein von 163 kDa, welches wiederum am DNA-Mismatch-Repair (MMR)-Pfad beteiligt ist. Der MMR-Mechanismus wird von sich normal vermehrenden Zellen verwendet, um Mutationen zu reparieren, die während der DNA-Replikation auftreten können. MSH6 bildet ein Heterodimer mit MutS-Protein-Homolog 2 (MSH2), welches für die direkte Erkennung von falsch ausgerichteten einzelnen Nukleotiden und Insertions-/ Deletionsschleifen verantwortlich ist. Dieser Komplex bezieht auch die MMR-Proteine PMS2 und MLH1 mit ein, die wiederum Polymerasen, Nukleasen und andere für die DNA-Reparatur verantwortlichen Proteine einbeziehen(1).

Ein MSH6-Defekt ist oft die Folge von Keimbahnmutationen bei Personen mit Beeinträchtigungen der Mismatch-Reparatur (1). Der Funktionsverlust von MSH6 führt zu einer erhöhten Mutationsrate und begünstigt die Entwicklung des sporadischen kolorektalen Karzinoms und des HNPCC (auchals Lynch-Syndrom bezeichnet). HNPCC, das für 1–5 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich ist, ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die aus der Keimbahnmutation von mindestens vier MMR-Genen entsteht, darunter *MSH2* (~40 %), *MLH1* (~50 %), *MSH6* (~5 %) und *PMS2* (<5 %); sie wird mit einer größeren Anfälligkeit für Kolon- und Endometriumkarzinome und zu einem geringeren Grade für andere Arten von Neoplasien in Verbindung gebracht (1-3). Deutliches Kennzeichen für Karzinome mit Defekten im MMR-Pfad ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), Änderungen in der Anzahl von Mikrosatellitenwiederholungen in der DNA aufgrund des fehlerhaften Reparaturprozesses (4, 5). Eine Keimbahnmutation in einer einzelnen MMR-Gen-Kopie stellt eine Prädisposition des Patienten für HNPCC dar, für die Entwicklung des Karzinoms ist allerdings der Funktionsverlust der verbleibenden Wildtyp-Kopie erforderlich. Mutationen in MSH6 sind für ca. 5 % aller Fälle von HNPCC verantwortlich (6), MSH6 hängt jedoch von MSH2 für eine stabile Expression ab, sodass auf der Proteinebene Tumoren mit MSH2-Defekt im Allgemeinen den damit einhergehenden Verlust von MSH6 aufweisen (7).

Antikörper gegen MSH6 sind hilfreich bei der Identifizierung von Mismatch-Repair-Defekten in Tumoren des Gastrointestinaltrakts einschließlich HNPCC und assoziierter Krebsarten außerhalb des Kolons durch Immunhistochemie (IHC). Mittels IHC nachgewiesene MSH6-Defekte wurden in Endometrium-, Ovarial-, Zervix-, Mamma- und Urothelkarzinomen, ampullären Karzinomen, Gehirntumoren, sowie in Talgdrüsentumoren, Keratoakanthomen und in einigen hämatologischen Malignitäten berichtet (8-16).

Siehe *Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder die Anweisungen des Detektionssystems von IHC-Verfahren.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Kaninchen-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: EP49. Isotyp: Kaninchen-IgG.

Immunogen

Synthetisches Peptid, das Rückständen am N-Terminus des menschlichen MSH6-Proteins entspricht.

Spezifität

Beim Western-Blot von A431-Zelllysaten erkannte der Anti-MSH6, Clone EP49 eine starke Bande bei 160 kDa, die mit dem erwarteten Molekulargewicht von MSH6 übereinstimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Für Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Metallazid in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben durchgeführt werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Kurzanleitung*

Schritt		Anmerkungen
Fixierung	Formalin	
Vorbehandlung	EnVision™ FLEX, High pH (Code-Nr. K8004)	20 Min. HIER, 3-in-1 mit PT Link und PT Link Rinse Station
Verdünnung	Gebrauchsfertig	20 Min. Inkubation
Verdünnungspuffer	Vorverdünnt	
Negativkontrolle	FLEX Negative Control, Rabbit (Code-Nr. IR600)	20 Min. Inkubation
Visualisierung	EnVision™ FLEX, High pH (Code-Nr. K8000)	20 Min. Inkubation, 2 x 5 Min. DAB+
Gegenfärbung	EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008)	5 Min. Inkubation
Kontrollgewebe	Appendix, Kolon	Nukleäre Färbung
Objektträger	FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)	Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an Glasobjektträgern
Fixierung	Nichtwässrige, permanente Fixierung erforderlich	Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels fixiert werden.
Geräte	Autostainer Link 48	Gerätespezifische Fläschchen verwenden (Code-Nr. SK201-SK203)

**Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.*

Probenvorbereitung

Paraffinschnitte: Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Vorbehandlung: Es ist eine Vorbehandlung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Die Vorbehandlung des Gewebes mit HIER unter Verwendung von verdünnter EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) wird empfohlen. Entparaffinierung, Rehydrierung und Epitopdemaskierung können im Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) vorgenommen werden. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Das Objektträgergestell aus dem PT Link-Behälter herausnehmen und die Objektträger sofort in ein Gefäß/einen Behälter (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Zimmertemperatur gebrachtem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code-Nr. K8007) eintauchen. Die Objektträger für 1–5 Minuten im Wash Buffer belassen.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Fixiermittels fixiert werden.

Färbeverfahren

Visualisierung: Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Link) (Code-Nr. K8000).

Programm: Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Das empfohlene Reagenz-Anwendungsvolumen ist 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link

entnehmen. Wenn die Protokolle auf der Autostainer Link-Plattform nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Das Installationsprogramm der Autostainer Link-Software ist unter www.dako.com\Installer erhältlich. Dieses Installationsprogramm aktualisiert die DakoLink Software mit Protokoll- und Reagenzinformationen für Anti-MSH6, Clone EP49. Der Kurzname für das Antikörperprotokoll ist MSH6 EP49. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Gegenfärbung: Die empfohlene Gegenfärbung ist EnVision™ FLEX Hematoxylin (Link) (Code-Nr. K8008). Für optimale Ergebnisse wird ein nichtwässriges permanentes Fixiermittel empfohlen.

Kontrollen: Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Die Positivkontrolle sollte Appendix- oder Kolongewebe enthalten und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Rabbit (Link) (Code-Nr. IR600).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist überwiegend nukleär.

Leistungs-eigenschaften

Gesunde Gewebe: Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49 markiert die Kerne einer Reihe von Zelltypen in gesundem Gewebe. Obwohl nicht in der Tabelle unten aufgezeigt, wurde eine positive nukleäre Färbung in Endothelzellen bei vielen Gewebetypen beobachtet. (17)

Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebeelemente	Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebeelemente
Nebennieren (3)	(3/3) Cortex (30–50 %), nukleär	Nebenschilddrüse (3)	(3/3) Epithel (20–90 %), nukleär
	(0/3) Medulla	Hypophyse (3)	(3/3) Endokrine Zellen (40–80 %), nukleär
Appendix (1)	(1/1) Epithel (100 %), nukleär	Prostata (3)	(3/3) Drüsen- und Duktusepithel (10–80 %), nukleär
	(1/1) Extrafollikuläre Lymphozyten (100 %), nukleär		(3/3) Stromazellen (30–50 %), nukleär
	(1/1) Glatte Muskelzellen (100 %), nukleär	Speichel-drüsen (3)	(3/3) Duktusepithel (50–80 %), nukleär
Knochenmark (3)	(3/3)Blastzellen (10–20 %), nukleär		(2/2) Drüsenepithel (50–80 %), nukleär
Mamma (3)	(1/1) Drüsenepithel (100 %), nukleär		(1/1) Glatte Muskelzellen (10 %), nukleär
	(2/2) Duktusepitel (100 %), nukleär		(1/1) Lymphoide Zellen (80 %), nukleär
	(1/1) Bindegewebe (30 %), nukleär		(2/2) Bindegewebszellen (30 %), nukleär
Zerebellum (3)	(3/3) Purkinje-Zellen (50–60 %), nukleär	Skelett-muskulatur (3)	(0/3) Muskulatur
	(0/3) Gliazellen		(3/3) Bindegewebe (50 %), nukleär
Zerebrum (3	(2/3) Gliazellen (30–50 %), nukleär	Haut (3)	(3/3) Basalepithel (30–80 %), nukleär
Zervix (3)	(3/3) Basalepithel (90 %), nukleär		(3/3) Schweißdrüsen (30–80 %), nukleär
	(3/3) Stromazellen (30 %), nukleär	Dünndarm (3)	(3/3) Epithel (80 %), nukleär
Kolon (3)	(3/3) Epithel (80 %), nukleär		(3/3) Glatte Muskelzellen (50 %), nukleär
	(2/2) Lymphozyten (50 %), nukleär	Milz (3)	(2/2) Lymphozyten (60 %), nukleär
	(3/3) Bindegewebe (40–50 %), nukleär		(1/1) Ruhende Lymphozyten (50 %), nukleär
Speiseröhre (3)	(3/3) Plattenepithel (50–70 %), nukleär		(3/3) Sinus auskleidende Zellen (rote Pulpa) (20–60 %), nukleär
	(3/3) Bindegewebe (10–30 %), nukleär	Magen (3)	(1/1) Bindegewebe (30 %), nukleär
Herz (3)	(3/3) Herzzellen (10–20 %), nukleär		(0/2) Epithel
	(3/3) Bindegewebe (30–50 %), nukleär		(0/1) Magendrüse
Niere (3)	(3/3) Tubuli (5–80 %), nukleär		(2/2) Glatte Muskelzellen (40–50 %), nukleär
	(3/3) Bowman-Kapsel (50 %), nukleär		(0/1) Lymphozyten
	(3/3) Glomerulus (20–30 %), nukleär	Hoden (3)	(3/3) Leydig-Zellen (50–80 %), nukleär
Leber (3)	(1/3) Hepatozyten (30 %), nukleär		(3/3) Tubuluszellen (20–30 %), nukleär
	(1/3) Gallengang (50 %), nukleär	Thymus (3)	(3/3) Cortex (80 %), nukleär
Lunge (3)	(2/2) Lymphozyten (50 %),		(3/3) Medulla (20–30 %), nukleär

	nukleär		
	(3/3) Alveolarepithel (50–80 %), nukleär	Schilddrüse (3)	(1/3) Follikelepithel (50 %), nukleär
Mesothelzellen (3)	(2/2) Mesothelium (100 %), nukleär		(1/3) Parafollikuläre C-Zellen (50 %), nukleär
	(3/3) Bindegewebe (30 %), nukleär	Mandel (3)	(3/3) Follikuläre Lymphozyten (70–90 %), nukleär
Nerv, peripher (3)	(3/3) Schwann-Zellen (10–20 %), nukleär		(3/3) Extrafollikuläre Lymphozyten (20–60 %), nukleär
	(3/3) Bindegewebe (20–30 %), nukleär		(3/3) Epithel (70–90 %), nukleär
Ovarium (3)	(3/3) Stromazellen (20–70 %), nukleär	Uterus (3)	(3/3) Drüsenepithel (30–60 %), nukleär
	(3/3) Follikelepithel (10–40 %), nukleär		(3/3) Stromazellen (10–60 %), nukleär
Pankreas (3)	(3/3) Azinuszellen (80–90 %), nukleär		(3/3) Myometrium (20–30 %), nukleär
	(3/3) Inselzellen (10–20 %), nukleär		
	(3/3) Zellen des Pankreasduktus (90 %), nukleär		

Pathologische Gewebe: Bei Tumoren mit MSH6-Defekt wird im Allgemeinen in den neoplastischen Zellen eine örtlich begrenzte oder keine nukleäre Färbung beobachtet. Eine Population aus benignen Zellen sollte nukleäre Färbung aufweisen und als interne Gewebekontrolle dienen.

Tumoren, die eine reduzierte oder heterogene Expression von MSH6 aufweisen, beherbergen möglicherweise auch pathogene Mutationen im *MSH6*-Gen und, in einigen Fällen, können normale, durch Immunhistochemie nachgewiesene MSH6-Expressionslevels beobachtet werden. Aktuelle Daten, die Anti-MSH6, Clone 44 verwenden, zeigen, dass 24 % von Kolon-Adenokarzinomen mit einer pathogenen *MSH6*-Mutation eine normale MSH6-Expression aufwiesen (18).

Literaturangaben

1. Peltomäki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis ofhuman cancer. J Clin Oncol 2003;21:1174-79.
2. Lynch, H. Smyrk, T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) An updated review. Cancer 1996;78:1149-67.
3. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. Am J Surg Pathol 1999;23:1248-55.
4. Lanza G, Gafà R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini, L. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. Mod Pathol 2002;15:741-9.
5. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, et al. Genetics of endometrial cancers. Obstet Gynecol Int 2010; 984013
6. Burgart, L.J. Testing for Defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma. A practical guide. Arch Pathol Lab Med 2005;129:1385–89.
7. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. Clin Genet 2009;76;1–18.
8. Planck M, Rambech E, Möslein G, Müller W, Olsson H, Nilbert M. High frequency of microsatellite instability and loss of mismatch-repair protein expression in patients with double primary tumors of the endometrium and colorectum**.** Cancer 2002;94:2502-10.
9. Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. Cancer 2008;113:733-42.
10. Buerki N, Gautier L, Kovac M, Marra G, Buser M, Heinimann K. Evidence for breast cancer as an integral part of Lynch syndrome. Gene Chrom Cancer 2012;51:83-91.
11. Walsh MD, Buchanan DD, Cummings MC, Pearson SA, Arnold ST, Clendenning M, et al. Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry. Clin Cancer Res 2010;16:2214-24.
12. Agaram NP, Shia J, Tang LH, Klimstra DS. DNA mismatch repair deficiency in ampullary carcinoma: a morphologic and immunohistochemical study of 54 cases. Am J Clin Pathol. 2010;133:772-80.
13. van der Post RS, Kiemeney LA, Ligtenberg MJ, Witjes JA, Hulsbergen-van de Kaa CA, Bodmer D, et al. Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. J Med Genet 2010;47:464-70.
14. Ripperger T, Beger C, Rahner N, Sykora KW, Bockmeyer CL, Lehmann U, et al. Constitutional mismatch repair deficiency and childhood leukemia/lymphoma--report on a novel biallelic MSH6 mutation. Haematologica 2010;95:841-4.
15. Ponti G, Losi L, Pedroni M, Lucci-Cordisco E, Di Gregorio C, Pellacani G, et al. Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. J Invest Dermatol 2006;126:2302-7.
16. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, Stávale JN, Hargrave D, Jones C, Reis RM. Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. PLoS One 2011;6:e20588.
17. MSH6 clone EP49 M3646.IR086 30 Normal Report D08986

18. Okkels H, Lindorff-Larsen K, Thorlasius-Ussing O, Vyberg M, Lindebjerg J, Sunde L, Bernstein I, Klarskov L, Holck S, Krarup HB. MSH6 Mutations are frequent in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with normal pMSH6 expression as detected by immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2012; Apr 10. [Epub ahead of print]

Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49 has been created by Epitomics Inc., using Epitomics' proprietary rabbit monoclonal antibody technology covered under Patent Nos 5,675,063 and 7,402,409.

Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49 a été créé par Epitomics Inc., suivant la technologie d'anticorps monoconal de lapin déposée de Epitomics, protégée par les brevets N° 5,675,063 et 7,402,409.

Monoclonal Rabbit Anti-Human MutS Protein Homolog 6, Clone EP49 wurde von Epitomics Inc. unter Verwendung der firmeneigenen Technik für monoklonale Kaninchen-Antikörper von Epitomics hergestellt und ist durch die Patente mit den Nummern 5,675,063 und 7,402,409 geschützt

REF Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Consult instructions for use *Consulter les instructions d'utilisation* *Gebrauchsanweisung beachten*
Manufacturer Fabricant Hersteller	LOT Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
EC REP Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU		IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum

PT0039/Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edition 05/12